

Em busca de Correlatos de Proteção para dengue (Dengue Protect study):
comparação dos efeitos da infecção pela dengue com os efeitos da administração
da Vacina Qdenga em Diferentes Grupos Etários

Unidade de Pesquisa Clínica
Centro de Terapias Avançadas e Inovadoras
UFMG

2023

1. Título

Em busca de Correlatos de Proteção para dengue (Dengue Protect study): comparação dos efeitos da infecção pela dengue com os efeitos da administração da Vacina Qdenga em Diferentes Grupos Etários

2. Pesquisadores participantes

Responsáveis

Mauro Martins Teixeira, UFMG

Fatima Brant, UFMG

Fernanda Tana, UFMG

Lisia Esper, UFMG

Pedro Almeida, UFMG

Colaboradores:

Ana Carolina Dias, Target

Adelino Melo, Target

Carolina Lucas, Yale

3. Resumo

O vírus da dengue (DENV), pertencente à família Flaviviridae, gênero Flavivirus, é um agente patogênico de extrema relevância na saúde pública global. O DENV é um dos mais importantes agentes causadores de doenças transmitidas por mosquitos no mundo, com cerca de 390 milhões de infecções estimadas anualmente. A principal dificuldade no desenvolvimento de uma vacina eficaz reside na complexidade do DENV que apresenta quatro distintos sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), cada um capaz de causar infecção, doença e morte. Um grande obstáculo até o momento está no desenvolvimento de uma vacina que ofereça proteção abrangente contra todos os tipos virais. Outro obstáculo relevante é a **falta de correlatos imunológicos de proteção, o que dificulta a avaliação da eficácia vacinal**. O objetivo principal deste estudo é **comparar a resposta imune** de indivíduos com **diferentes faixas etárias** que foram **vacinados com a Qdenga** com aqueles **infectados pela dengue**. Nossa abordagem envolve a análise de múltiplos parâmetros imunológicos, incluindo respostas imunológicas humorais e celulares. Cada um dos coortes será estratificado por idade (18-60 e > 60 anos) e status imunológico prévio (ie. indivíduos previamente infectados ou não pelo DENV) e pretendemos avaliar a magnitude e a durabilidade da resposta imunológica. Ao comparar a resposta imune após a vacinação com a resposta gerada por uma vacina reconhecidamente eficaz, pretendemos **identificar correlatos imunológicos de proteção** que estejam associados à eficácia vacinal. Esta pesquisa é um estudo de coorte prospectiva em que dois coortes principais serão estabelecidos: **Coorte Vacinal:** Participantes que receberão a Vacina QDenga (Takeda); **Coorte infecção:** Participantes com diagnóstico de infecção aguda virologicamente confirmada (RT-PCR ou NS1 positivos) pelo DENV. Iremos recrutar **200 participantes** (100 em cada coorte), homens e mulheres, com idades entre 18 e 90 anos, estratificados de acordo com a idade e exposição prévia ao DENV (exposição prévia definida como IgG+ para dengue). O estudo será de responsabilidade e será realizado na Unidade de Pesquisa Clínica do Centro de Terapias Avançadas e Inovadoras da UFMG.

4. Introdução e Justificativa

O vírus da dengue (DENV), pertencente à família Flaviviridae, gênero Flavivirus, é um agente patogênico de extrema relevância na saúde pública global. O DENV é um dos mais importantes agentes causadores de doenças transmitidas por mosquitos no mundo, com cerca de 390 milhões de infecções estimadas anualmente. Transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti*, o vírus da dengue tem distribuição principalmente em regiões tropicais e subtropicais [1, 2]. A infecção pelo vírus pode resultar em uma ampla gama de manifestações clínicas, desde casos assintomáticos até quadros graves, como a dengue hemorrágica, síndrome do choque da dengue, e morte. Composto por um genoma de RNA de cadeia simples, o vírus apresenta quatro diferentes sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) [3].

Ao longo dos últimos 75 anos, pesquisadores buscam desenvolver uma vacina segura e eficaz contra a dengue. Apesar da exploração de diversas abordagens vacinais, até o momento apenas as vacinas utilizando o vírus atenuado avançaram em estudos clínicos. A principal dificuldade no desenvolvimento de uma vacina eficaz reside na complexidade do DENV que apresenta quatro distintos sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), cada um capaz de causar infecção, doença e morte [4]. Um grande obstáculo até o momento está no desenvolvimento de uma vacina que ofereça proteção abrangente contra todos os tipos virais. Outro obstáculo relevante é a *falta de correlatos imunológicos de proteção, o que dificulta a avaliação da eficácia vacinal* [5]. Além disso, os modelos animais disponíveis não conseguem reproduzir completamente o quadro clínico observado em humanos. A superação desses desafios é essencial para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a dengue.

Recentes avanços têm trazido esperança nesse cenário. Duas novas vacinas contra a dengue que usam em sua formulação o vírus atenuado alcançaram a fase III dos ensaios clínicos. Uma delas, chamada TAK-003 e desenvolvida pela Takeda (vendida comercialmente com o nome de QDenga), recebeu aprovação regulatória em países como Indonésia e Brasil. A vacina foi testada em países com elevada endemicidade viral, envolvendo milhares de participantes de diversas faixas etárias. A TAK-003 é administrada em duas doses vacinais, com intervalo de três meses entre as doses. A vacina pode ser utilizada em indivíduos a partir dos quatro anos de idade, independentemente do status imunológico inicial para a dengue (indivíduos previamente infectados ou não pelo vírus da dengue podem receber a vacina). Os resultados dos ensaios clínicos

foram promissores, mostrando que a vacina TAK-003 é eficaz na prevenção da dengue em uma variedade de contextos epidemiológicos [6, 7, 8, 9].

No Brasil, a vacina desenvolvida em colaboração do Butantan-DV com o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH) está em fase avançada de estudos fase III com resultados bastante promissores [10]. Esta vacina ainda está em fase de testes e sua aprovação aguarda a finalização dos estudos clínicos e aprovação pelas autoridades regulatórias.

Apesar dos desafios persistentes, o sucesso alcançado nas fases finais dos ensaios clínicos pela TAK-003 e preliminares com a vacina Butantan-DV abre novas perspectivas na luta contra a dengue. Estas vacinas representam passos significativos no desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra a dengue, capaz de proteger populações diversas contra os diferentes sorotipos do vírus.

A resposta imune desencadeada pelo DENV é caracterizada pelo aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos ao interagirem com linfócitos T auxiliares ativados. São observados níveis elevados de interleucina-2 (IL-2) e de seu receptor solúvel, interferon- γ (IFN γ), interferon- α (IFN- α) que se mantêm até a convalescença, além do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de ativação de plaquetas (PAF) [11]. O papel dos macrófagos e dos linfócitos T auxiliares nesse contexto é fundamental para o entendimento da patogênese da dengue e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes. É importante notar que, além da resposta imune, características específicas do indivíduo infectado, como comorbidades e idade do hospedeiro, tem também sido associadas à evolução clínica para formas mais graves da doença.

A idade representa um fator modulador chave dos riscos de desenvolver dengue grave tanto em infecções primárias quanto secundárias. Observa-se que o risco relativo de se desenvolver formas mais graves da doença aumentam com a idade do hospedeiro [12]. Portanto, é crucial obter um entendimento mais claro dessa relação visando o desenvolvimento de novas estratégias para o controle da dengue. Compreender como a idade influencia a gravidade da infecção pode ser essencial para implementar medidas preventivas mais efetivas e adaptadas a diferentes faixas etárias, contribuindo assim para reduzir o impacto da doença na população.

Na dengue, casos assintomáticos são mais frequentes do que casos sintomáticos. No entanto, uma pequena proporção de infecções por DENV pode levar ao desenvolvimento de casos graves, caracterizados por importante extravasamento de líquido e eventualmente hemorragia [13].

O mecanismo pelo qual somente alguns indivíduos progridem para formas graves da dengue ainda não é totalmente compreendido. Frequentemente, tais formas são associadas à infecção sequencial com DENVs de diferentes sorotipos provocando uma resposta inflamatória exacerbada, que envolve complexa interação entre o vírus e o hospedeiro. A imunidade humoral desencadeada contra o sorotipo infectante inicial frente ao sorotipo da infecção secundária, favorece a infecção celular, resultando em títulos virais aumentados e ativação imune desregulada, evento conhecido como *Antibody-dependent Enhancement* (ADE) [14, 15, 16]. Embasados em um dos principais mecanismos fisiopatogênicos das formas graves da dengue, torna-se necessário compreender os mecanismos de interação vírus-hospedeiro em indivíduos previamente expostos ou não aos distintos sorotipos do DENV.

Sabendo da proteção existente com o uso da vacina QDenga, nossa proposta de estudo visa validar os correlatos imunológicos de proteção após a administração desta vacina. Como comparador, avaliaremos a resposta imune após um episódio de infecção pela dengue. Portanto, neste estudo participantes serão recrutados de forma longitudinal após administração da primeira e segunda dose vacinal e os resultados da resposta imune após a vacinação serão comparados com aqueles de pacientes diagnosticados com dengue.

5. Objetivos

Objetivo geral: O objetivo principal deste estudo é *comparar a resposta imune* de indivíduos com *diferentes faixas etárias* que foram *vacinados com a Qdenga* com aqueles *infectados pela dengue*.

Para alcançar esse objetivo, o estudo empregará uma abordagem abrangente de estudo da resposta imune que não foi utilizado nos estudos vacinais. Teremos duas coortes: uma coorte de *indivíduos vacinados* em que se avaliará a resposta imune após a primeira e segunda dose da QDenga e um segundo coorte em que avaliaremos a resposta imune em *indivíduos após um episódio de infecção aguda* pela dengue. Nossa abordagem envolve a análise de múltiplos parâmetros imunológicos, incluindo respostas imunológicas humorais e celulares. Cada um dos coortes será estratificado por idade (18-60 e > 60 anos) e status imunológico prévio (ie. indivíduos previamente infectados ou não pelo DENV) e pretendemos avaliar a magnitude e a durabilidade da resposta imunológica. Ao comparar a resposta imune após a vacinação com a resposta gerada

por uma vacina reconhecidamente eficaz, pretendemos **identificar correlatos imunológicos de proteção** que estejam associados à eficácia vacinal. A validação desses correlatos é instrumental na implementação, monitoramento e otimização de vacinas eficazes. Estes correlatos, que podem ser quantitativos (como titulações de anticorpos) ou qualitativos (como análise de funções efectoras de células T ou análises do repertório de célula B), oferecem uma representação direta da proteção imunológica contra infecções. Desta forma, pretendemos elucidar os mecanismos de resistência, associados ao controle viral, induzidos após vacinação. Nesse contexto, o estudo de anticorpos e células B desempenha um papel central na compreensão da imunidade contra infecções virais. A resposta aos vírus da Dengue mediada por anticorpos é complexa e paradoxal. Embora anticorpos neutralizantes sejam cruciais para a proteção contra o vírus, anticorpos não neutralizantes podem, em certos contextos, potencializar a infecção e agravar o quadro clínico. Portanto, entender a dinâmica dos anticorpos em relação ao Dengue é essencial. Neste estudo, focaremos na avaliação do repertório de células B induzido pela vacinação. Além de analisar a diversidade celular, também investigaremos aspectos como polivalência, somaticidade e maturação da afinidade. Avaliaremos, ainda, a especificidade e afinidade dos anticorpos produzidos, buscando decifrar o perfil da resposta humoral gerada após a imunização. Adicionalmente, entender como a vacina modula as respostas imunes em diferentes faixas etárias é crucial para adaptar e otimizar estratégias vacinais.

Objetivos específicos:

Em *indivíduos vacinados* pela QDenga e em *indivíduos após um episódio de infecção aguda*

- I. Avaliar o **perfil imunológico** geral de nas diferentes faixas etárias;
- II. Caracterização detalhada das **respostas imunológicas humoral e celular** vírus-específica;
- III. Avaliação do **repertório de células B** e isolamento de anticorpos monoclonais.

6. Resultados Esperados

Tendo em vista os objetivos descritos no item 5 do projeto, os resultados esperados são:

- I.** Descrição detalhada da resposta imune induzida após vacinação e infecção em participantes adultos jovens ou idosos previamente expostos ou não à dengue.
- II.** Identificação fatores imunes (imunidade celular ou humoral) associados com proteção antiviral induzidos após vacinação.

III. Identificação dos clones de células B vírus específico expandidos e mantidos após vacinação, e isolamento de anticorpos monoclonais com maior capacidade de neutralização viral.

7. Metodologia

O estudo é um estudo de coorte que será conduzido na Unidade de Pesquisa Clínica do CT Terapias da UFMG. O estudo será divulgado em saúde, clínicas e na UFMG através de folhetos e mídias sociais. Serão recrutados participantes potenciais com um teste laboratorial positivo obtido durante a triagem de rotina e participantes sem apresentação clínica aguda de dengue. O Estudo terá duração de 36 meses ou até alcance do número de indivíduos planejados.

7.1 Desenho básico

Esta pesquisa é um estudo de coorte prospectiva em que dois coortes principais serão estabelecidos (ver Figura 1):

1. Participantes que receberão a Vacina QDenga (Takeda) – ***Coorte Vacinal***
2. Participantes com diagnóstico de infecção aguda virologicamente confirmada (RT-PCR ou NS1 positivos) pelo DENV – ***Coorte infecção***.

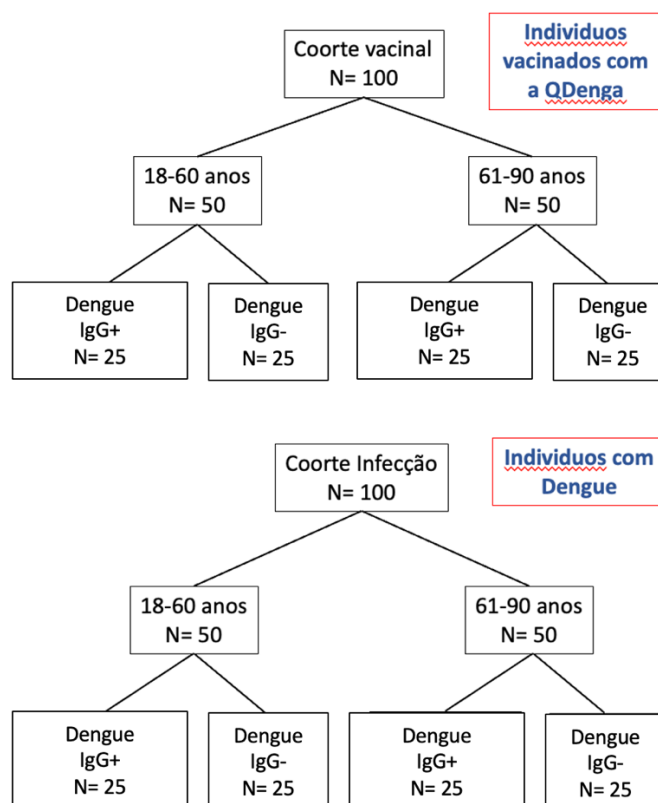


Figura 1: Desenho básico dos dois coortes do estudo. Total de 200 participantes.

Coorte Vacinal

Iremos recrutar 100 participantes, homens e mulheres, com idades entre 18 e 90 anos, estratificados de acordo com a idade e exposição prévia ao DENV (exposição prévia definida como IgG+ para dengue).

- **Grupo coorte Vacinal 1 (CV1)** - 50 participantes com idade entre 18 e 60 anos. Entre eles, 25 participantes terão sido previamente expostos ao vírus da dengue e os demais 25 participantes serão *naïve*, isto é não tendo sido previamente infectados pelo vírus. Para ser considerado não exposto ao DENV, o indivíduo fará um teste rápido de anti-DENV IgG imediatamente antes da vacinação (resultado negativo – Dengue IgG-; resultado positivo – Dengue IgG+). Posteriormente faremos o ensaio de Elisa (Anti-DENV IgG) e ensaio de soroneutralização para confirmar o teste rápido e definir a real exposição prévia neste indivíduo.

- **Grupo coorte Vacinal (CV2)** - 50 participantes com idade entre 61 e 90 anos serão recrutados. Entre eles, 25 participantes terão sido previamente expostos ao vírus da dengue e os demais 25 participantes serão *naive*, isto é não tendo sido previamente infectados pelo vírus. Para ser considerado não exposto ao DENV, o indivíduo fará um teste rápido de anti-DENV IgG imediatamente antes da vacinação (resultado negativo – Dengue IgG-; resultado positivo – Dengue IgG+). Posteriormente faremos o ensaio de Elisa (Anti-DENV IgG) e ensaio de soroneutralização para confirmar o teste rápido e definir a real exposição prévia neste indivíduo.

Após a obtenção do consentimento, serão realizadas as seguintes visitas ***Coorte Vacinal***:

- **Visita 1 (V1)** ou visita inicial – Avaliação dos critérios de inclusão e exclusão, exame clínico e coleta de amostras antes da vacinação (Baseline). Após a coleta, o participante será vacinado pela vacina QDenga e ficará em observação pelo período mínimo de 30 min.
- **Visita 2 (V2)** – 3 meses após a primeira dose da vacina, o participante será examinado pela equipe médica, serão coletadas novas amostras de sangue, será administrada a segunda dose da vacina QDenga e o participante ficará em observação pelo período mínimo de 30 min.
- **Visita 3 (V3)** – 7($\pm$ 1) dias após a segunda dose vacinal. O participante será examinado pela equipe médica e serão coletadas amostras de sangue.
- **Visita 4 (V4)** – 2 meses após a segunda dose vacinal. O participante será examinado pela equipe médica e serão coletadas amostras de sangue.
- **Visita 5 (V5)** – 6 meses após a segunda dose vacinal. O participante será examinado pela equipe médica e serão coletadas amostras de sangue.

De cada participante incluído neste estudo serão coletadas as seguintes amostras de sangue para a realização de exames laboratoriais complementares em cada uma das visitas previstas no estudo (detalhados abaixo):

- 27 ml de sangue em Heparina para obtenção de PBMC (3 tubos de 9ml);
- 4 ml de sangue em EDTA para obter plasma (citocinas, RNA, “buffy coat”);
- 5 ml de sangue para obtenção de soro (resposta imune humoral).

Coorte Infecção

Iremos recrutar 100 participantes, homens e mulheres, com idades entre 18 e 90 anos, com diagnóstico de dengue virologicamente confirmado (RT-PCR ou NS1 positivos) ***em até 5 dias do início dos sintomas*** e estratificados de acordo com a idade e exposição prévia ou não ao DENV (exposição prévia definida como IgG+ para dengue).

- **Grupo coorte Infecção 1 (CI1)** - 50 participantes com idade entre ***18 e 60 anos***. Entre eles, 25 participantes terão sido previamente expostos ao vírus da dengue e os demais 25 participantes serão *naive*, isto é não tendo sido previamente infectados pelo vírus. Para ser considerado não exposto ao DENV, o indivíduo fará um teste rápido de anti-DENV IgG (resultado negativo – Dengue IgG-; resultado positivo – Dengue IgG+). Posteriormente faremos o ensaio de Elisa (Anti-DENV IgG) e ensaio de soroneutralização para confirmar o teste rápido e definir a real exposição prévia neste indivíduo.

- **Grupo coorte Infecção (CI2)** - 50 participantes com idade entre ***61 e 90 anos*** serão recrutados. Entre eles, 25 participantes terão sido previamente expostos ao vírus da dengue e os demais 25 participantes serão *naive*, isto é não tendo sido previamente infectados pelo vírus. Para ser considerado não exposto ao DENV, o indivíduo fará um teste rápido de anti-DENV IgG (resultado negativo – Dengue IgG-; resultado positivo – Dengue IgG+). Posteriormente faremos o ensaio de Elisa (Anti-DENV IgG) e ensaio de soroneutralização para confirmar o teste rápido e definir a real exposição prévia neste indivíduo.

Após a obtenção do consentimento e confirmação do diagnóstico, serão realizadas as seguintes visitas no ***Coorte Infecção***.

- **Visita 1 (V1)** ou visita inicial – Avaliação dos critérios de inclusão e exclusão, exame clínico e coleta de amostras.
- **Visita 2 (V2)** – 2 meses após o diagnóstico atual de dengue. O participante será examinado pela equipe médica e serão coletadas amostras de sangue.
- **Visita 3 (V3)** – 6 meses após o diagnóstico atual de dengue. O participante será examinado pela equipe médica e serão coletadas amostras de sangue.

De cada participante incluído neste estudo serão coletadas as seguintes amostras de sangue para a realização de exames laboratoriais complementares em cada uma das visitas previstas no estudo (detalhados abaixo):

- 30 ml de sangue em Heparina para obtenção de PBMC (3 tubos de 10ml);
- 4 ml de sangue em EDTA para obter plasma (mediadores inflamatórios);
- 4 ml de sangue para obtenção de soro (resposta imune humoral).

Como não é possível detalhar exatamente o dia da infecção aguda (picada pelo mosquito infectado) em pacientes com dengue, as amostras de entrada do coorte de infecção (V1) serão comparadas às amostras coletadas durante a V3 (7º dia após a segunda dose da vacina) no coorte de vacinação.

7.3 Triagem e Avaliação de Elegibilidade

Como mencionado acima, este estudo terá dois coortes.

No **coorte vacinal**, serão selecionados indivíduos de ambos os sexos de 18-90 anos de idade e que não apresentem as contraindicações em bula da vacina (gravidez, lactante, imunossuprimidos). Para pacientes do sexo feminino com potencial reprodutivo, serão oferecidos gratuitamente métodos anticoncepcionais a serem acordados entre o participante e o co-investigador que atenderá o participante no dia.

Critérios de inclusão coorte vacinal:

1. Participantes entre 18-90 anos de idade que aceitem participar do estudo.
2. Ausência de quadro clínico agudo no momento da vacinação.

Critérios de exclusão coorte vacinal:

1. Participantes menores de 18 anos
2. Participantes que não estiverem disponíveis para realizar as visitas planejadas do estudo;
3. Participantes que não concordarem em assinar o TCLE;
4. β -HCG positivo no dia da vacinação, no caso de mulheres com potencial reprodutivo;
5. Participantes Grávidas ou que planejam engravidar nos próximos 3 meses após a última dose da vacina.
6. Participantes amamentando
7. O participante com um defeito conhecido ou suspeito do sistema imunológico que pode influenciar a resposta imunológica à vacina, como participantes com imunodeficiência

congenita ou adquirida, incluindo infecção pelo HIV, estado pós-transplante de órgão ou terapia imunossupressora dentro de 4 semanas antes da Visita 1. A terapia imunossupressora é definida como a administração crônica de prednisona (mais de 14 dias) ou equivalente ≥ 2 mg/kg/dia nas 4 semanas anteriores à entrada no estudo, radioterapia ou drogas citotóxicas imunossupressoras/anticorpos monoclonais nos 3 anos anteriores; esteroides tópicos e inalatórios são permitidos.

No **coorte infecção**, serão selecionados indivíduos de ambos os sexos de 18-90 anos de idade com diagnóstico de dengue virologicamente confirmado (RT-PCR ou NS1 positivo) com até 5 dias do início dos sintomas.

Critério de inclusão no **coorte infecção**:

1. Participantes entre 18-90 anos de idade
2. Caso de dengue aguda até 5 dias do início dos sintomas
3. Diagnóstico confirmado de Dengue (RT-PCR ou NS1 positivo)
4. Que aceitem participar do estudo.

Critério de exclusão no **coorte infecção**:

1. Participantes menores de 18 anos
2. Participantes com mais de 5 dias de sintomas
3. Participantes que não concordarem em assinar o TCLE.
4. Participantes que não estiverem disponíveis para realizar as visitas planejadas do estudo;

7.4 Local do Estudo

O estudo será de responsabilidade e será realizado na Unidade de Pesquisa Clínica do Centro de Terapias Avançadas e Inovadoras da UFMG. Todos os membros da equipe da unidade de Pesquisa Clínica do Centro de Terapias da UFMG deverão possuir certificados de adequação para cada função (enfermeiro, médico clínico etc.) que desempenham. Todo o laboratório de suporte e equipe de pesquisa que manipula amostras e dados biológicos são treinados e certificados para boas práticas clínicas [p.e., Programa da Iniciativa de Treinamento Institucional Colaborativo (CITI)], conforme exigido pelas boas práticas de pesquisa clínica. Além disso, toda a equipe será

treinada anualmente em POPs detalhados que cobrem todos os itens de pesquisa clínica, incluindo a confidencialidade e privacidade do paciente.

7.5 Consentimento informado.

Versões escritas dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos (TCLE) serão apresentadas aos participantes detalhando a natureza exata do estudo, o que isso envolverá para o participante e quaisquer riscos envolvidos na sua participação. Cada participantes assinará o TCLE correspondente ao coorte em participará. Será declarado claramente que o participante é livre para se retirar do estudo a qualquer momento por qualquer motivo, sem prejuízo aos cuidados futuros e sem obrigação de fornecer o motivo da retirada. O participante terá tanto tempo quanto for necessário para ponderar as informações, desde que permaneça elegível e dentro do prazo de recrutamento para o estudo, com a oportunidade de questionar o investigador ou outras partes independentes para decidir se eles participarão. A aplicação do TCLE será então documentada por uma assinatura do participante com a data e a assinatura da pessoa que o apresentou e obteve o consentimento. A pessoa que obteve o consentimento deve ser devidamente qualificada e experiente e ter sido delegada a fazê-lo pelo PI do site. Uma via do TCLE assinado será entregue ao participante, a outra via assinada será arquivada no centro de pesquisa.

A vacina QDenga está aprovada para uso clínico no Brasil, mas não é recomendada para uso em gestantes. Durante este estudo, para as participantes do sexo feminino da Coorte Vacinal, por se tratar de uma vacina de vírus vivo atenuada, todo cuidado será tomado para evitar exposição das mulheres grávidas à vacina. Portanto, todas as participantes do sexo feminino serão consideradas com potencial de engravidar, exceto aquelas que tenham antecedente documentado de histerectomia, laqueadura ou estejam na menopausa (12 meses de amenorreia após seu último período menstrual).

Serão excluídas do estudo mulheres em idade reprodutiva com Gravidez confirmada por teste β -hCG (realizado na admissão), estar amamentando e/ou manifestar intenção de ter práticas sexuais com potencial reprodutivo sem uso de método contraceptivo nos três meses seguintes à vacinação. Para participantes do sexo feminino com potencial de engravidar, o médico do estudo avaliará a necessidade de iniciar a utilização de um método contraceptivo antes do recebimento da vacina. Os métodos contraceptivos não serão obrigatórios caso a voluntária declare isenta ao risco de engravidar, quer por não exercer práticas sexuais ou por exercê-las de forma não reprodutiva,

até 1 mês após a vacina. Se ainda assim a paciente se engravidar nos próximos 3 meses após a segunda dose da vacina, ela será acompanhada durante toda a gravidez em serviço especializado de Obstetrícia até o parto, e se necessário, até um período de 6 semanas após o parto.

7.6 Tamanho Amostral

O estudo avaliará se a média/ mediana de parâmetros clínicos, epidemiológicos e moleculares será influenciada de três fatores (status vacinal, idade, exposição à dengue) com dois níveis cada (vacinação x infecção prévia, 18-60 x 61-90 anos, exposição x não exposição à dengue). Serão necessários 25 indivíduos alocados em cada um dos oito grupos (tratamentos) (total de 200 participantes) para atingir um poder de 80%, considerando um nível de significância de 5% e capacidade de detecção de um tamanho de efeito f de média magnitude ($f = 0.2$). O cálculo amostral foi realizado no programa G*Power versão 3.1.9.4

7.7 Procedimentos da pesquisa

7.7.1 Coorte Vacinal:

Visita 1 (V1) ou visita inicial –

O participante será acolhido pelo grupo de pesquisadores do projeto, que explicará todo o estudo e sanará suas dúvidas. Havendo o consentimento por escrito para participar do estudo, será feito a avaliação de elegibilidade e, se confirmada, o participante será incluído no estudo. Serão obtidos dados demográficos básicos, questionamento sobre doenças prévias e uso de medicação concomitante. O participante fará um exame físico detalhado. Serão obtidas amostras de sangue como detalhado no protocolo. O participante será vacinado com a primeira dose da QDenga conforme recomendação do fabricante, e será observado por 30 min, momento no qual serão discutidas medidas de prevenção da gravidez, quando couber. O participante será solicitado para retornar em 3 meses após a dose inicial. O participante receberá um número de telefone da equipe e poderá entrar em contato caso tenha alguma dúvida em relação ao estudo ou tenha alguma dúvida sobre a vacinação. Ele poderá também retornar caso haja alguma dúvida médica ou necessite de atendimento.

Visita 2 (V2) – 3 meses ($\pm$ 2 semanas) após a primeira dose da vacina,

O participante será acolhido pelo grupo de pesquisadores do projeto e será encaminhado para aferição de dados vitais. Serão revistos os dados do uso de medicação concomitante. O participante terá um exame físico detalhado, serão obtidas amostras de sangue como detalhado no protocolo. O participante será vacinado com a segunda dose da QDenga conforme recomendação do fabricante e será observado por 30 min, momento no qual serão discutidas medidas de prevenção da gravidez, quando couber e será solicitado para retornar em 7 dias.

Visita 3 (V3) – 7($\pm$ 1) dias após a segunda dose vacinal.

O participante será acolhido pelo grupo de pesquisadores do projeto e será encaminhado para aferição de dados vitais. Serão retiradas quaisquer dúvidas relatadas pelo participante. O participante terá um exame físico detalhado, serão obtidas amostras de sangue como detalhado no protocolo e será solicitado para retornar em 8 semanas (2 meses após a segunda dose da vacina).

Visita 4 (V4) – 2 meses ($\pm$ 2 semanas) após a segunda dose vacinal.

O participante será acolhido pelo grupo de pesquisadores do projeto e será encaminhado para aferição de dados vitais. Serão retiradas quaisquer dúvidas relatadas pelo participante. O participante terá um exame físico detalhado, serão obtidas amostras de sangue como detalhado no protocolo e será solicitado para retornar em 4 meses (6 meses após a segunda dose da vacina).

Visita 5 (V5) – 6 meses ($\pm$ 3 semanas) após a segunda dose vacinal.

O participante será acolhido pelo grupo de pesquisadores do projeto e será encaminhado para aferição de dados vitais. Serão retiradas quaisquer dúvidas relatadas pelo participante. O participante terá um exame físico detalhado, serão obtidas amostras de sangue como detalhado no protocolo. O participante encerrará sua participação no estudo.

7.7.2 Coorte Infecção.

Visita 1 (V1) ou visita inicial –

O participante com diagnóstico de dengue será acolhido pelo grupo de pesquisadores do projeto, que explicará todo o estudo e sanará suas dúvidas. Havendo o consentimento por escrito para participar do estudo, será feito a avaliação de elegibilidade e, se confirmada, o participante será incluído no estudo. Serão obtidos dados demográficos básicos, questionamento sobre doenças

prévias e uso de medicação concomitante. O participante fará um exame físico detalhado. Serão obtidas amostras de sangue como detalhado no protocolo. O participante será informado sobre os riscos da doença e procedimentos necessários para evitar a progressão da mesma, sempre seguindo as recomendações básicas da rede Municipal de saúde. O participante receberá um número de telefone da equipe e poderá entrar em contato caso seu quadro clínico deteriore ou haja qualquer dúvida sobre sua participação ou sobre sua doença. Ele poderá também retornar ao centro caso haja alguma dúvida médica ou necessidade de atendimento.

Visita 2 (V2) – 2 meses ($\pm$ 2 semanas) após o episódio agudo de infecção (considerada como a V1).

O participante será acolhido pelo grupo de pesquisadores do projeto e será encaminhado para aferição de dados vitais. Serão retiradas quaisquer dúvidas relatadas pelo participante. O participante terá um exame físico detalhado, serão obtidas amostras de sangue como detalhado no protocolo e será solicitado para retornar em 4 meses (6 meses após o episódio de infecção aguda).

- **Visita 3 (V3)** – 6 meses ($\pm$ 3 semanas) após o episódio agudo de infecção (considerada como a V1).

O participante será acolhido pelo grupo de pesquisadores do projeto e será encaminhado para aferição de dados vitais. Serão retiradas quaisquer dúvidas relatadas pelo participante. O participante terá um exame físico detalhado, serão obtidas amostras de sangue como detalhado no protocolo. O participante encerrará sua participação no estudo ou acompanhamento poderá ser mantido apenas a critério médico.

7.8 Procedimento com as amostras do estudo

As amostras serão transferidas para instalações do laboratório do Centro de Terapias da UFMG, onde serão submetidas a testes de acordo com as melhores práticas de medidas de laboratório e procedimentos de segurança. Os pacientes que consentem podem rescindir seu consentimento até a conclusão do estudo. A menos que solicitado, as amostras coletadas antes da data de retirada serão retidas para análise do estudo. As amostras de sangue serão rotuladas com um número de identificação (ID), mas não com o nome do paciente. Qualquer teste adicional além do indicado neste estudo será testado somente após a permissão do Comitê de Ética local.

7.8.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Para o isolamento das PBMCs e plasma, amostras de sangue total dos voluntários serão coletadas em tubos contendo heparina. As células serão isoladas por centrifugação em gradiente de densidade, utilizando 20 mL de Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, EUA) para cada 10 mL de sangue seguido de 40 minutos de centrifugação a 200G. O plasma será armazenado para análises posteriores e a monocamada de PBMCs obtida será coletada e transferida para tubo estéril contendo 40mL de PBS e centrifugadas a 400G por 10 minutos. Após a lavagem com PBS, as células serão ressuspensas em 1 mL de meio RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS). A viabilidade celular será avaliada através da contagem das células utilizando o corante Azul de Trypan 0,2%. Após análise da viabilidade, as células serão congeladas em FBS 10% DMSO e armazenadas em freezer -80°C.

7.8.2 Avaliação da resposta imune celular

Para análise da resposta imune mediada por células, as PBMCs obtidas de participantes vacinados conforme descrito anteriormente, serão distribuídas em microplacas de cultura estéreis e estimuladas com DENV inativado por 2 horas por radiação ultravioleta ou outro estímulo relevante (antígeno ou estimulação inespecífica de leucócitos). Para controle negativo, as PBMCs serão incubadas com meio RPMI. Após 24 a 48 horas, os sobrenadantes das culturas serão coletados para dosagem mediadores inflamatórios e da resposta imune, incluindo a dosagem de citocinas e quimiocinas através da técnica de ELISA ou similar (eg. Mesoscale).

7.8.3 Medições de citocinas e quimiocinas

O plasma do paciente será isolado após centrifugação e alíquotas serão armazenadas a -80°C. Os níveis de citocinas, quimiocinas e outros marcadores imunológicos serão medidos utilizando o painel Plex Human Cytokine Array/Chemokine Array 71-403 (HD71). Todas as amostras serão medidas após o primeiro descongelamento.

7.8.4 Caracterização fenotípica de leucócitos do sangue e single-cell análises

PBMCs de pacientes vacinados serão plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^6 células, sob estímulo DENV inativado, pool de peptídeos virais específicos para células

T CD4 e CD8 por 24h. Controles serão realizados utilizando antígeno, PMA/Ionomomicina ou na ausência de estímulo. As células serão cultivadas na presença de Brefeldina nas últimas 8h de estímulo (Golgi Stop, BD) para interrupção da secreção de citocinas em cultura. As PBMCs serão lavadas por duas vezes com PBS e serão centrifugadas a 300g por 10 minutos, para remoção de qualquer proteína solúvel no meio de cultura, e incubadas com reagente de viabilidade celular (Live/Dead Fixable Dead Cell Stains), conforme recomendado pelo fabricante (Invitrogen). A suspensão celular será marcada com 4 painéis contendo anticorpos para a avaliação do grau de ativação de células mieloides e linfócitos B e T e mononucleares. A incubação com os anticorpos extracelulares será realizada por 20 minutos e as células serão lavadas duas vezes por centrifugação por 4 minutos a 300xg com tampão de FACS (PBS, 0,1% BSA, 2mM azida). Posteriormente a suspensão celular será fixada e permeabilizada para a avaliação da produção de mediadores e presença de marcadores intracelulares. Para fixação e permeabilização serão utilizados os tampões eBioscience (Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer), de acordo com as especificações do fabricante. A incubação, com os anticorpos extracelulares será realizada por 20 minutos e as células serão lavadas por centrifugação por 4 minutos a 300xg com tampão de FACS. A análise dos dados será realizada utilizando o programa FlowJo 10 (TreeStar). Para análise mais profunda de células T vírus específicas, após estímulo ex-vivo com antígenos virais e marcação por citometria de fluxo, células T recém ativadas serão sortadas e coletadas para análises de sequenciamento do receptor de células T (TCR) para caracterização da diversidade e clonalidade após vacinação.

7.8.5 Caracterização de plasmócito e células B de memória vírus-específicas

Para análise da resposta imune mediada por células B, as PBMCs obtidas de participantes vacinados conforme descrito anteriormente, serão distribuídas em microplacas de cultura estéreis na concentração de 1×10^6 células e estimuladas ex-vivo com antígenos virais.

Após a estimulação, plasmócitos e células B de memória específicas serão identificadas e quantificados por citometria de fluxo utilizando marcadores de superfície celular específicos, incluindo CD19 e CD27, entre outros. Posteriormente, essas células B de memória serão isoladas individualmente por triagem celular, permitindo a obtenção de células B monoclonais específicas para o antígeno. O repertório e a clonalidade das células B serão analisados por sequenciamento dos receptores de células B (BCR). Para produção de anticorpos monoclonais, as células B

monoclonais serão expandidas in vitro e o DNA das células isoladas será sequenciado para caracterizar o repertório de imunoglobulinas.

7.8.6 Dosagem de IgG circulantes e soroneutralização

A dosagem de anticorpos IgG anti-DENV será realizada utilizando-se kits de ELISA comercialmente disponíveis e seguindo a recomendação do fabricante. Nos grupos controles relevantes, faremos também a dosagem de anticorpos para CHIV. Nestas amostras procederemos à realização das reações de soroneutralização em células Vero utilizando vírus obtidos e isolados na epidemia atual. O título de soro neutralização será calculado para a concentração do soro capaz de inibir 50 e 90% das placas de lise em células Vero.

7.9 Dados e análise estatística:

7.9.1. Acesso aos dados

O acesso direto será concedido a representantes autorizados, comitês de ética locais e autoridades reguladoras para monitoramento e/ou auditoria do estudo para garantir a conformidade com os regulamentos. Dados de resultado e dados de atribuição de tratamento serão disponibilizados para análise em tempo real.

7.9.2. Tratamento de Dados e Manutenção de Registros

Os dados do estudo clínico serão registrados em CRFs e inseridos em um banco de dados protegido por senha pelo PI do estudo local, enfermeira pesquisadora ou pessoa designada. O banco de dados do estudo será construído no sistema REDCap, um sistema de gerenciamento de dados clínicos em conformidade com ICH GCP e regulação do FDA, título 21 do *Code of Federal Regulations* Parte 11. Será hospedado em um servidor seguro e com acesso restrito.

Serão tomadas medidas para garantir a não divulgação de informações potencialmente prejudiciais aos pacientes. Registros em papel (por exemplo, informações de identificação do paciente para fins de acompanhamento, registros de triagem e TCLEs assinados) serão mantidos em armários trancados; os dados eletrônicos só estarão acessíveis ao pessoal com contas de usuário e senhas. O banco de dados contém uma trilha de auditoria que mantém o registro das alterações nos dados e na atividade do usuário no banco de dados. Todos os dados eletrônicos serão

armazenados em servidores seguros com backup diário, com armazenamento fora do local semanalmente.

Os registros do paciente no local serão, levando em consideração a capacidade dos locais, armazenados em fichários na sala segura de acesso limitado. Os registros serão retidos por pelo menos cinco anos após a conclusão do estudo ou de acordo com a regulamentação local do local. O banco de dados do estudo será mantido indefinidamente.

7.9.3 Gerenciamento dos dados e análise estatística.

O estudo será conduzido de acordo com os regulamentos relevantes e procedimentos operacionais padrão. O estudo será conduzido em conformidade com este protocolo, as Diretrizes da Conferência Internacional de Harmonização (ICH) para Boas Práticas Clínicas (GCP) e qualquer requisito regulamentar aplicável. As amostras biológicas serão processadas e armazenadas de acordo com os POPs do Centro de Pesquisa. A validação dos dados será realizada para identificar erros ou discrepâncias e, assim, garantir a integridade, validade e precisão dos dados.

As variáveis inteiras ou contínuas serão expressas por média e desvio-padrão ou mediana e intervalo interquartil. As variáveis categóricas serão apresentadas com frequências absolutas e relativas. A normalidade de variáveis será testada com o teste de Shapiro-Wilk enquanto a igualdade de variância será analisada com o teste F ou Bartlett. As diferenças de média ou mediana serão avaliadas por testes de Wilcoxon, Kruskal-Wallis, teste T ou análise de variância considerando o número de grupos e pressupostos de cada teste. As associações entre variáveis categóricas serão testadas por teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. Os coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman serão estimados para explorar a existência de associação linear entre variáveis contínuas ou inteiras. Os modelos lineares e lineares generalizados serão utilizados para estruturas multivariadas e dados com relações temporais ou espaciais serão explorados com modelos de efeitos aleatórios ou equações de estimação generalizadas. As estimativas de tempo até a ocorrência de um evento serão feitas através de modelos de Cox ou equivalente não paramétricos. O nível de significância será de 5%.

8. Considerações éticas

Este estudo tem dois coortes: um coorte vacinal e um coorte de indivíduos com diagnóstico agudo de dengue. No coorte vacinal, utilizaremos uma vacina (QDenga) aprovada pela Anvisa para uso em seres humanos. Os participantes serão acompanhados durante o processo de imunização e até um período de 6 meses após a segunda dose da vacina. No coorte infecção, acompanharemos participantes que tiverem um quadro agudo de dengue pelo período de 6 meses com o objetivo de avaliar a resposta imune da doença e comparar com indivíduos vacinados. Aos pacientes serão oferecidos os melhores tratamentos disponibilizados pelo sistema de saúde e sempre conforme as recomendações locais e nacionais para acompanhamento e tratamento das arboviroses. Os riscos associados à participação na pesquisa envolvem o risco habitual da dengue (no coorte infecção) ou da vacinação com uma vacina aprovada (coorte vacinal) e eventual desconforto no exame clínico e na obtenção de amostras de sangue. Para minimizar esses riscos, o acompanhamento e os exames serão realizados por clínicos experientes e a coleta de sangue será realizada por equipe treinada no processo e capaz de lidar com os efeitos adversos associados ao procedimento (lipotimia e hematoma, em especial).

8.1. Declaração de Helsinki

O Investigador garantirá que este estudo seja conduzido de acordo com a revisão atual da Declaração de Helsinki.

8.2. Diretrizes para Boas Práticas Clínicas

O Investigador garantirá que este estudo seja conduzido de acordo com os regulamentos relevantes e com as Boas Práticas Clínicas (ICH GCP).

8.3. Aprovações

O protocolo e o formulário de consentimento informado serão submetidos aos comitês de ética local para aprovação por escrito. O Investigador apresentará e, quando necessário, obterá a aprovação das partes acima para todas as alterações nos documentos originais aprovados.

8.4. Confidencialidade do paciente

A equipe do estudo irá garantir que o anonimato dos participantes seja mantido. Os participantes serão identificados apenas por um número de identificação do participante em todos os documentos do estudo e em qualquer banco de dados eletrônico, com exceção da CRF, onde as iniciais do participante podem ser adicionadas. O nome e qualquer outro detalhe de identificação NÃO serão incluídos em nenhum arquivo eletrônico de dados do estudo. Todos os documentos serão armazenados de forma segura e acessíveis apenas pela equipe do estudo, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos e eventuais auditores externos do estudo. Todos os documentos serão armazenados de forma segura e acessíveis apenas pela equipe do estudo e pessoal autorizado. O estudo estará em conformidade com a Lei de Proteção de Dados 2018, que exige que os dados pessoais não sejam mantidos como dados identificáveis por mais tempo do que o necessário para os fins em questão.

8.5. Despesas

Os participantes serão reembolsados por quaisquer custos associados a pesquisa incluindo custos de transporte ao local do estudo para as visitas programadas e alimentação, tanto para participantes quanto para seu acompanhante.

8.6. Riscos

Os riscos associados à participação na pesquisa envolvem eventual desconforto no exame clínico e na obtenção de amostras de sangue. Para minimizar esses riscos, os exames serão realizados por clínicos experientes e a de sangue coleta será por equipe treinada no processo e capaz de lidar com os efeitos adversos associados ao procedimento (lipotimia e hematoma, em especial).

8.7. Benefícios

A participação no estudo poderá eventualmente beneficiar o sujeito da pesquisa. Na eventual identificação de problemas clínicos, o sujeito será encaminhado para propedêutica e/ou terapêutica no sistema de saúde. Embora um paciente individual possa não se beneficiar pessoalmente, este estudo deve ajudar no desenvolvimento de novas vacinas para a dengue. Os

participantes serão reembolsados pelos custos associados à viagem ao local do estudo e alimentação.

9. Cronograma de atividades

Coorte vacinal

Procedimentos	Visita 01 Inclusão	Visita 02 3 meses após 1ª dose	Visita 03 7 dias após 2ª dose	Visita 04 2 meses após 2ª dose	Visita 05 6 meses após 2ª dose
Consentimento informado	X				
Avaliação de elegibilidade	X				
Dados demográficos, História médica e exame físico	X				
Revisão de dados clínicos pós vacinais e exame físico		X	X	X	X
Sangue					
Heparina 30 ml ^a	X	X	X	X	X
EDTA 3,5 ml ^b	X	X	X	X	X
SST 3,5 ml ^c	X	X	X	X	X

- a- Sangue heparinizado será utilizado para obtenção de PBMC e posterior estudo da resposta imune.
- b- O sangue EDTA será utilizado para obtenção de plasma e posterior mensuração de mediadores inflamatórios.
- c- O sangue em SST será utilizado para obtenção de soro e avaliação de anticorpos circulantes.

Coorte Infecção

Procedimentos	Visita 01 Infecção	Visita 02 2 meses após infecção	Visita 03 6 meses após infecção
Consentimento informado	X		
Avaliação de elegibilidade	X		
Dados demográficos, História médica e exame físico	X		
Exames complementares a critério médico	X		
Exame Clínico de acompanhamento		X	X
Sangue			
Heparina 30 ml ^a	X	X	X
EDTA 5 ml ^b	X	X	X
SST 5 ml ^c	X	X	X

- a- Sangue heparinizado será utilizado para obtenção de PBMC e posterior estudo da resposta imune.
- b- O sangue EDTA será utilizado para obtenção de plasma e posterior mensuração de mediadores inflamatórios.
- c- O sangue em SST será utilizado para obtenção de soro e avaliação de anticorpos circulantes.

10. Financiamento

O estudo será financiado por recursos próprios e advindos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Dengue e Interações microorganismo-hospedeiro, projeto este financiado pelo CNPq/Fapemig e CAPES (Projeto número [465425/2014-3] - CHAMADA PÚBLICA MCTI/CNPQ/CAPES/FAPS Nº 16/2014 - PROGRAMA INCT), coordenado pelo Prof Mauro Martins Teixeira, que submete a presente proposta de estudo.

11. Referências:

- [1] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7.
- [2] Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8):e1760.
- [3] Higuera, Adriana, and Juan David Ramírez. "Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update." *Acta tropica* vol. 190 (2019).
- [4] Shukla R, Ramasamy V, Shanmugam RK, Ahuja R, Khanna N. Antibody-Dependent Enhancement: A Challenge for Developing a Safe Dengue Vaccine. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Oct 22;10:572681.
- [5] Nivarthi, U.K., Swanstrom, J., Delacruz, M.J. et al. A tetravalent live attenuated dengue virus vaccine stimulates balanced immunity to multiple serotypes in humans. *Nat Commun* 12, 1102 (2021).
- [6] Tricou, V, Sáez-Llorens X, et al. Safety and immunogenicity of a tetravalent dengue vaccine in children aged 2-17 years: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2020. (20)30556-0.
- [7] Biswal S, et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 4 -16 years: a randomized, placebo controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2020. 2020;395:1423-1433.
- [8] Lopez-medina, E.; Biswal, S.; Saez-llorens, X.; Borja-tabora, C. et al. Efficacy of a Dengue Vaccine Candidate (TAK-003) in Healthy Children and Adolescents 2 Years after Vaccination. *J Infect Dis*, 225, n. 9, p. 1521-1532, May 4 2022.
- [9] Rivera, L.; Biswal, S.; Saez-llorens, X.; Reynales, H. et al. Three-year Efficacy and Safety of Takeda's Dengue Vaccine Candidate (TAK-003). *Clin Infect Dis*, 75, n. 1, p. 107-117, Aug 24 2022.
- [10] Kallas, E. G.; Precioso, A. R.; Palacios, R.; Thome, B. et al. Safety and immunogenicity of the tetravalent, live-attenuated dengue vaccine Butantan-DV in adults in Brazil: a two-step, double-blind, randomised placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Infect Dis*, 20, n. 7, p. 839-850, Jul 2020.
- [11] Figueiredo LTM. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. *Medicina (Ribeirão Preto)* [Internet]. 30 de março de 1999;32(1):15-20. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/7749>
- [12] Tsheten T, Clements ACA, Gray DJ, Adhikary RK, Furuya-Kanamori L, Wangdi K. Clinical predictors of severe dengue: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty*. 2021 Oct 9;10(1):123.
- [13] Bhatt, Puneet et al. "Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection." *Current microbiology* vol. 78,1 (2021).
- [14] Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest*. 2004;113(7):946-51.
- [15] Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):532-43.
- [16] Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res*. 2003;60:421-67.